

L'INFRASTRUCTURE DU PLASMALEMME
DE *DUNALIELLA BIOCULATA* (ALGUE VERTE)
MISE EN ÉVIDENCE D'UN CELL-COAT;
ESSAI DE LOCALISATION DES CHARGES NÉGATIVES

R. CHARDARD*

RÉSUMÉ. — L'observation au M.E. de l'Algue verte unicellulaire *D. bioculata* Butcher révèle la présence d'un revêtement fibreux qui recouvre le feuillet externe du plasmalemme. Ce «cell-coat» est constitué de fibrilles plus ou moins longues (25-200 nm) disposées irrégulièrement à la surface cellulaire; elles sont cependant moins denses que celles observées dans les cellules animales.

Les différentes techniques cytochimiques utilisées suggèrent que ces fibrilles seraient de nature glycoprotéiques. Les charges négatives localisées à leur niveau seraient dues, au moins en partie, à la présence d'acide sialique qui a été mis en évidence par des méthodes chimiques, mais dont la concentration reste cependant très faible.

SUMMARY. — Electron microscopy of the unicellular green alga *D. bioculata* Butcher shows the presence of a fibrous coat on the external lamella of the plasmalemma. The cell-coat consists of 25-200 nm long fibrils placed irregularly on the cell surface. They are however less dense than in animal cells.

Various cytochemical tests suggest the fibrils to be glycoproteic. The negative charges on fibrils are due, at least partly to sialic acid which can be chemically detected, although present in very low concentration.

MOTS CLÉS : Chlorophyta, *Dunaliella bioculata*; microscopie électronique; plasmalemme; «cell-coat»; charges négatives; protéoglycane; acide sialique.

INTRODUCTION

La structure de la membrane cellulaire des cellules animales est maintenant bien connue, à la suite d'études faites au ME sur de nombreux types cellulaires à l'aide de divers réactifs et techniques. Ces études ont montré que la surface cellulaire est limitée extérieurement par une couche fibrillaire plus ou moins épaisse appelée glycocalyx ou «cell-coat». Les études cytochimiques ont précisé la nature chimique de ces fibrilles : ce sont des molécules de glycoprotéines

* Laboratoire de Biologie végétale, Faculté des Sciences, B.P. 347, 51062 Reims.

Laboratoire de Physiologie cellulaire, 12 rue Cuvier, 75005 Paris.

c'est-à-dire des protéines filamenteuses portant latéralement des glucides; accessoirement, on rencontre des glycolipides. Dans la cellule végétale, la situation est différente car la membrane est recouverte par une paroi de nature pecto-cellulosique qui la protège, mais aussi la rend difficilement accessible aux réactifs et aux investigations directes, sauf chez certains organismes ou dans certaines circonstances : champignons Myxomycètes (RYTER et HELLIO, 1980); algues Volvocales : *Dunaliella tertiolecta* (OLIVEIRA et al., 1980); Uivales : *Enteromorpha prolifera* (LAUR et JONSSON, 1983); protoplastes de végétaux supérieurs (CHARDARD, 1984); Cyanophycées : *Anabaena* (De VECCHI et GRILLI CAIOLA, 1986).

Pour préciser la structure du « cell-coat » des cellules végétales, la nature des molécules responsables des charges négatives, leur localisation à la surface de la cellule, nous avons étudié la surface cellulaire de l'Algue *Dunaliella bioculata* Butcher qui présente la particularité de ne pas posséder de paroi. Les résultats obtenus avec ce matériel sont rapportés dans cette Note.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Dunaliella bioculata (Culture collection of Algae and Protozoa Cambridge) est cultivée au laboratoire en milieu artificiel (GRIZEAU et al., 1982) à la température de la pièce (20-23°C). La lumière est fournie par des tubes fluorescents (Intensité lumineuse moyenne : 20 W.m⁻²); le régime lumineux est de 16 heures de lumière et 8 h d'obscurité.

Traitement pour le M.E.

Les cellules sont fixées par le glutaraldéhyde (GA) 1,75 à 3,5 % (provenant d'une ampoule à 70 %) dissous dans un des milieux suivants :

- milieu de culture lui-même (pH: 7,2)
- cacodylate de Na (0,05 à 0,1 M), pH 7,2 + NaCl 0,5 M
- cacodylate de Na + saccharose (0,25 à 1 M) (EVANS et HOLLIGAN, 1972)
- cacodylate de Na + paraformaldéhyde suivant KARNOVSKY (1965)
- tris-HCl 0,05 M, pH 7,2 + mannitol 0,9 M pendant 1 h 30 à 4°C
- tris-maélate 0,2 M pH 5,4 + sorbitol 1,2 M (avec la neuraminidase).

Après 3 lavages dans le milieu tamponné hypertonique (à 4°C), les cellules sont soit post-fixées directement par OsO₄ 1%, soit traitées par les différents réactifs décrits ci-dessous, puis après lavage, post-fixées par OsO₄ pendant 1 à 12 h à la température de la pièce.

Après lavage rapide, les cellules sont alors collectées par centrifugation, enrobées dans la gélose, déshydratées par l'éthanol puis par l'oxyde de propylène et incluses dans l'épon. Les coupes sont confectionnées avec l'ultra-microtome REICHERT OMU 2 et observées avec le microscope électronique JEM 100 C à 80 KV.

Traitements utilisés pour la mise en évidence du «cell-coat»

- coloration classique des coupes par l'acétate d'uranyle-plomb suivant VENABLE et al. (1965).
- traitement au ferro-osmium suivant HEPLER (1980).
- traitement PATAG d'après THIERY (1967).
- emploi de traceurs : peroxydase de racine de raifort (HRP Sigma, type II) dissoute dans le milieu de culture à la concentration de 4 mg par ml et appliquée pendant des temps variant de 0h30 à 3h. L'activité de la peroxydase a ensuite été révélée par le tétrachlorure de diaminobenzidine (DAB 4 HCl) (Sigma) et H₂O₂ suivant la technique de GRAHAM et KARNOVSKI (1966).

Essais de localisation des charges négatives par différentes molécules polycationiques.

- bleu alcyan 8 G (Michrome n° 24) GURR (BA) suivant NILSSON et BEHNKE (1971)
- rouge de ruthénium (RR) (0,1 %) suivant LUFT (1966)
- hydroxyde de fer colloïdal (HFC) d'après NICOLSON (1972) (modification de la technique de GASIC et al., 1963-1968)
- ferritine cationisée (FC) (ferritine couplée avec le N,N'-diméthyle-1,3-propane-diamine (DMPA), Sigma lot 20 F 80603) appliquée sur les cellules vivantes en milieu hypertonique et suivie d'une fixation par le GA sans lavage préalable (DANON et al., 1972).

Recherche sur la nature du cell-coat.

- Action de la pronase B à la concentration de 400 µg/ml, pendant des temps variant de 15 à 60 minutes, à la température de 26°C, sur des cellules vivantes ou fixées préalablement par le GA. Après lavage, les cellules sont traitées par FC ou par HFC.
- Action de la neuraminidase (Nanase) (Sigma, type VIII, lot 129 C 8055-1) à la concentration de 1 à 5 U par ml de milieu contenant les cellules vivantes; ensuite traitement par HFC ou par FC (GASIC et al., 1963). La Nanase a été utilisée soit dissoute dans le tampon acétate 0,1 M pH 5,4 rendu hypertonique par NaCl (0,5 M), soit dans le tampon tris-maléate à même pH.

Dosage des acides sialiques.

Le dosage des acides sialiques a été effectué à partir de cellules qui ont été traitées suivant deux conditions :

1 - Les cellules ont été fixées pendant 36h à 4°C par GA 3,5 % dissous dans le milieu de culture, lavées puis déshydratées par l'éthanol souvent renouvelé jusqu'à l'élimination complète des pigments.

2 - Les cellules ont été placées directement dans l'éthanol 70 % puis traitées comme précédemment.

Dans les deux cas, on a appliqué la méthode de WARREN (1959) pour la recherche de l'acide sialique par action de l'acide périodique-acide barbiturique

et la lecture de la densité optique au spectrophotomètre à $\lambda = 549$ nm. Une gamme étalon contenant une quantité connue d'acide sialique a été réalisée et a permis d'évaluer la concentration d'acide sialique provenant des cellules.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Présence d'un « cell-coat ».

L'observation au ME du plasmalemme de *Dunaliella* après fixation par le GA dans certaines conditions dépendant notamment du tampon et de la substance osmorégulatrice (les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant comme solution tampon le milieu de culture lui-même ou le cacodylate-saccharose à pH 7,2) montre, après coloration par l'acétate d'uranyle-plomb, un empâtement à peu près continu du feuillet externe du plasmalemme sur 20 à 30 nm d'épaisseur; cette technique ne permet pas de préciser sa structure. Avec le traitement par le ferro-osmium (HEPLER, 1980), la structure du plasmalemme est plus grossière, mais révèle, sur le feuillet externe des fibrilles courtes et denses (fig. 4, flèches).

Action des traceurs.

La peroxydase (HRP) est une enzyme de PM assez élevé (= 40.000 d) qui, en elle-même n'est pas visible au ME; mais lorsque elle est fixée par le GA, puis révélée par H_2O_2 et un dérivé de la benzidine : la DAB-4-HCl, elle catalyse la formation d'un polymère opaque aux électrons après action de OsO_4 .

En utilisant la peroxydase comme traceur, on peut mettre en évidence, chez *Dunaliella*, une couche opaque aux électrons, à la limite du cytoplasme (par cette technique, on ne peut révéler le plasmalemme) (fig. 2), de 20 à 30 nm d'épaisseur; sa limite interne est nette, alors que la limite externe est plus irrégulière.

Le dépôt noir observé sur le plasmalemme indique donc la localisation de l'enzyme adsorbée par une couche surmontant le feuillet externe du plasmalemme dont la structure n'apparaît pas avec cette technique. Cependant cette réaction n'a aucune signification quant à la nature chimique des fibrilles du « cell-coat »; les témoins, qui n'ont pas été en contact avec la peroxydase, ne montrent aucun précipité, ce qui indique également l'absence de peroxydase endogène (fig. 3).

Techniques cytochimiques

La réaction PATAG (THIÉRY, 1967) met en évidence la structure de ce « cell-coat », en même temps qu'elle apporte une précision sur sa nature chimique (fig. 5). Elle montre en effet un revêtement dense de fibres assez courtes (30-40 nm) dont la structure fine, avec cette technique, reste imprécise par suite de leur densité (fig. 6, rfc) et des fibrilles plus longues (100-200 nm), au trajet sinueux, dispersées à la surface du plasmalemme (fig. 6, fl). La longueur mesurée ne représente pas la longueur réelle, car la taille des grains d'argent diminue la résolution et empêche de suivre leur trajet d'une manière précise (fig. 5, 6, 7 et 8).

Ces diverses techniques montrent que *Dunaliella* possède un plasmalemme recouvert d'un revêtement fibreux constitué de deux sortes de fibrilles : les unes courtes, serrées et abondantes se présentent comme un empâtement du feuillet externe du plasmalemme dont la structure est ainsi difficile à mettre en évidence; les autres, fines, longues et moins nombreuses sont disposées de place en place. La surface cellulaire de *Dunaliella* ressemble donc à un tapis à poils ras duquel émergent des poils «longs». Ce revêtement fibreux est rarement rencontré chez les cellules végétales, car la présence d'une paroi gêne souvent l'observation du plasmalemme; il n'a été signalé que chez *Dunaliella tertiolecta* (OLIVEIRA et al., 1980). Il est présent chez la plupart des cellules animales et a reçu le nom de glycocalyx puis de «cell-coat». L'usage a privilégié l'emploi de ce dernier terme. Dans les cellules prélevées dans le tissu, il reste mince (50-100 Å); dans quelques catégories de cellules où le plasmalemme est directement en contact avec le milieu, le «cell-coat» présente un développement important (épaisseur : 200-1000 Å) : unicellulaires (*Amoeba*, *Trypanosoma*, *Gregarina* (SCHREVEL et al. 1979); cellules isolées (érythrocytes, LUFT, 1976); cellules présentant un bord libre (entérocytes, THIÉRY et RAMBOURG, 1974; cellules du rein, LUFT, 1976), etc.

Le «cell-coat» de *Dunaliella* n'est cependant pas rigoureusement analogue à celui des cellules animales. L'association des fibrilles courtes et longues semble assez originale. La structure la plus proche rencontrée dans les cellules animales se trouve chez *Amoeba proteus* où le «cell-coat» comprend deux parties : «amorphous layer» et «fuzzy layer» (SCHREVEL et al., 1979). On remarquera toutefois que les fibrilles de *Dunaliella* sont plus fines que celles d'*Amoeba* (dont le diamètre est compris entre 100 et 600 Å) et moins longues et moins denses que celles des entérocytes où elles peuvent atteindre 500 à 2000 Å de long.

Du point de vue chimique, la réaction positive du test PATAG au niveau des fibrilles, caractérisée par la présence de grains d'argent absents chez les témoins (fig. 9) confirme d'une part l'existence d'un revêtement fibreux et d'autre part signale la présence de polysaccharides sur les fibrilles.

Essais de localisation des charges négatives.

Dans les cellules animales, les fibrilles du «cell-coat» sont des glycoprotéines portant des acides sialiques (MATOSKA et SIRACKY, 1980; NICOLSON, 1973) dont les groupements acides sont responsables des charges négatives détectées à la surface du plasmalemme et qui peuvent être révélées en utilisant de petites molécules cationiques (bleu alcyan, rouge de ruthénium) ou des complexes polycationiques tels que l'hydroxyde de fer colloïdal (HFC) ou la ferritine cationisée (ferritine-DMPA).

A la différence de ce qu'ont obtenu d'autres auteurs (OLIVEIRA et al. 1980; NILSSON et al., 1971), le BA nous a toujours donné des résultats négatifs, quelles que soient les conditions utilisées. Le RR, par contre, appliqué suivant la technique de LUFT (1966) met en évidence un revêtement dense aux électrons, de 40 à 80 nm d'épaisseur, de forme irrégulière, dans laquelle on recon-

naît, suivant les incidences de la coupe, des pyramides, des piliers, ou même parfois un dépôt continu (fig. 19). Sa structure est homogène. On peut penser que les fibrilles n'apparaissent pas avec cette technique parce qu'elles sont agglomérées sous l'effet des charges positives du RR à qui sa petite taille moléculaire permet de pénétrer jusqu'à la base des fibrilles (fig. 20). Certaines coupes subtangentielles du plasmalemme (fig. 18, en bas de la figure) montrent une structure en «nid d'abeilles», comme si les fibrilles étaient localisées sur le plasmalemme suivant un dessin géométrique. Il est plus vraisemblable que ces figures sont le résultat des réactions entre les charges négatives des fibrilles et les charges positives du marqueur.

Avec la ferritine cationisée (FC), on observe également un marquage discontinu de la surface cellulaire : des agrégats de grains de ferritine sont déposés de place en place sur le plasmalemme (fig. 10, flèches), avec cependant une certaine variabilité suivant les cellules ou les régions cellulaires : parfois toute la cellule est couverte par de tels agrégats disposés à intervalles réguliers (fig. 10); sur d'autres cellules, ces agrégats sont localement abondants et peuvent même confluer alors que le reste de la cellule en est dépourvu : enfin d'autres cellules n'en présentent aucun.

L'examen à plus fort grossissement de ces agrégats montre que les granules de ferritine ne sont pas déposés directement sur le plasmalemme, mais à une certaine distance de celui-ci, de l'ordre de 50 à 100 nm, comme si les charges négatives avec lesquelles ils réagissent étaient localisées uniquement à l'extrémité des fibrilles «longues», dont on soupçonne la présence dans certains cas (fig. 11, flèches). Cet aspect, différent de celui observé après d'autres marqueurs, appelle quelques commentaires :

— Les agrégats de ferritine. Ils peuvent être interprétés comme le résultat de l'attraction des charges positives de la molécule de FC sur les groupes électro-négatifs situés à l'extrémité des fibrilles «longues».

— Les différences de marquage entre le RR et la FC. La réaction positive avec le RR implique l'existence de charges négatives sur toute la longueur des fibrilles, alors que la localisation des molécules de ferritine indique des charges négatives uniquement à leur extrémité. On peut expliquer ces différences en admettant qu'elles sont dues à la taille des molécules du marqueur. En effet, la FC est une grosse molécule organique qui peut avoir des difficultés à atteindre la base des fibrilles, alors que la molécule de RR, de relativement petite taille, est plus apte à parvenir à leur base.

L'hydroxyde de fer colloïdal (HFC) appliqué suivant la technique de NICOLSON (1972), se dépose sur le plasmalemme en formant un liseré très dense, dû à la diffraction des électrons par les molécules de fer. A plus fort grossissement ($\times 60.000$, fig. 13), on voit que ce liseré n'est pas une structure simple mais qu'il est formé en réalité d'un film continu directement appliqué sur le plasmalemme et de dépôts irréguliers situés à une certaine distance de lui, auquel ils sont reliés par des piliers. La réaction avec HFC est considérée comme l'une des plus spécifiques des charges négatives (GASIC et al. 1968); les résultats obtenus avec cette méthode sont donc précieux : ils indiquent que chez *Dura-*

liella, les charges négatives sont réparties aussi bien sur les fibrilles «courtes» que sur les fibrilles «longues». On doit cependant tenir compte que le pH très bas (1,6) auquel réagit HFC n'est pas favorable à une bonne conservation des structures et peut ainsi provoquer des distorsions dans la répartition des charges négatives.

Malgré certaines divergences de détail dans les résultats obtenus avec les différentes techniques, on peut conclure que les fibrilles qui forment le «cell-coat» de *Dunaliella* portent des charges négatives dues vraisemblablement à la présence de fonctions acides, comme chez les cellules animales et chez certaines cellules végétales (HELLIO et RYTER, 1980; OLIVEIRA et al., 1980; LAUR et JONSSON, 1983; CHARDARD, 1984; DE VECCHI et CAIOLA, 1986). Toutes les cellules ne présentent pas le même aspect sans doute parce que la présence des fibrilles ainsi que leur nature chimique sont sujettes à variations, en rapport avec l'état physiologique des cellules et plus particulièrement avec les étapes de renouvellement du plasmalemme.

Nature chimique des fibrilles.

Action de la pronase

Pour connaître la nature chimique des fibrilles, savoir si elles sont glycoprotéiques ou glycolipidiques, nous avons fait agir la pronase B sur les cellules vivantes (il n'y a pas d'effet sur les cellules fixées) pendant 15 à 60 minutes; après lavage, elles ont été traitées par FC. On constate qu'après des temps «courts» (30 mn), le marquage est encore présent (fig. 14), mais d'aspect différent de celui observé normalement sur les cellules non traitées par la pronase (fig. 10 et 11) : les grains de ferritine forment un dépôt mince, presque continu, déposé directement sur le plasmalemme, sans formation d'agrégat important. Pour expliquer cette localisation on doit admettre que les charges négatives libérées par l'attaque de la fibrille protéique sont adsorbées par d'autres composés membranaires ou bien que l'hydrolyse des fibrilles «longues» rend accessible aux marqueurs électropositifs les sites négatifs des fibrilles «courtes».

Après des temps plus longs (60 mn), aucun marquage n'apparaît (fig. 15), indiquant que les fibrilles ont disparu. On peut donc conclure que les fibrilles hydrolysées par l'enzyme sont de nature protéique.

Action de la neuraminidase (Nanase)

Après action de la Nanase en tampon acétate à pH 5,4, on observe une simplification de la structure membranaire, notamment une disparition du «cell-coat», mais aussi une mauvaise conservation des autres constituants cellulaires et du plasmalemme. Les cellules témoins traitées par le tampon acétate seul à pH 5,4 meurent en 30 mn. Un autre tampon, le tris-maléate, essayé à ce même pH, produit seulement un arrêt de la motilité cellulaire et se montre ainsi moins défavorable. Nous avons donc utilisé la Nanase dissoute dans le tampon tris-maléate sur les cellules vivantes, suivi d'un traitement par FC ou par HFC (dans ce dernier cas, après fixation). Les résultats obtenus avec ces deux marqueurs ne sont pas concordants : après HCF (fig. 16), un liseré dense dû aux molécules

ferriques entoure encore la membrane; il est cependant plus fin que chez les témoins (comparer les fig. 12 et 16). Après action de la FC par contre, on ne distingue plus aucun marquage par la ferritine, ce qui signifierait une disparition des charges négatives par hydrolyse de l'acide sialique (fig. 17), si la technique était entièrement sûre. Mais la structure caractéristique du plasmalemma a également disparu au cours de ce traitement, indiquant que l'on est en présence de cellules «pelées» sous l'action de l'enzyme ou du tampon au pH utilisé. L'action de la Nanase ne donne donc pas de renseignements significatifs quant à la nature chimique des molécules porteuses des charges négatives.

En conclusion des études cytochimiques entreprises, on peut dire que les cellules de *Dunaliella* sont entourées par un «cell-coat» fibrillaire dont les constituants sont des fibrilles «courtes» et «longues» de nature vraisemblablement glycoprotéique, c'est-à-dire constituées de protéines structurales plus ou moins longues portant latéralement des glucides (bien que la technique de RAMBOURG (1967) à l'acide phosphotungstique en milieu très acide, qui détecte les groupements hydroxyles des glycoprotéines, ait donné des résultats négatifs) et des charges négatives dues sans doute à des fonctions acides. Dans les cellules animales, c'est l'acide sialique qui tient ce rôle (MATOSKA et SIRACKY, 1980). Nous avons donc essayé de caractériser chimiquement cette substance chez *Dunaliella*.

Recherche de l'acide sialique

Elle a été effectuée par la méthode de WARREN (1959) au periodate-acide barbiturique qui a fait ses preuves dans l'étude de la cellule animale et dans certaines cellules végétales (LAUR et JONSSON, 1983).

Les résultats obtenus par la lecture au spectrophotomètre de la densité optique (DO) à $\lambda = 549$ nm sont les suivants :

	Condition 1 (cellules fixées par le GA)	Condition 2 (cellules fixées par l'éthanol)
lecture au temps t_0 de la DO	0,038	0,016
lecture au temps t_1 (après 2 mn) de la DO	0,037	0,018

On peut expliquer les différences obtenues entre les conditions 1 et 2 en admettant que le GA utilisé en 1 préserve mieux les glycoprotéines que l'éthanol, ce qui est confirmé par les électronographies. Par comparaison avec la gamme étalon établie à partir de solutions titrées d'acide sialique, on trouve que les résultats de la condition 1 correspondent à une concentration en acide sialique de l'ordre de $1 \mu\text{g}$ pour une aliquote de $200 \mu\text{l}$. Le volume initial du surnageant était de $2,5 \text{ ml}$; la teneur totale en acide sialique est donc de $12,5 \mu\text{g}$ pour 463 millions de cellules (numérations faites avec la cellule de MALASSEZ). On voit que l'acide sialique, s'il est présent à la surface de la cellule de *Dunaliella*

n'y est qu'en très faible proportion. Il existe donc, à cet égard, une différence importante avec les cellules animales, où les quantités d'acide sialique par rapport au poids des cellules sont beaucoup plus importantes. Chez les quelques cellules végétales où la recherche de l'acide sialique a été faite, on note une grande diversité : les sialo-glycoprotéines recouvrent la membrane d'*Enteromorpha prolifera* (LAUR et JONSSON, 1983) alors qu'elles sont absentes de la surface du Myxomycète *Dictyostelium discoideum* (GILKES et WEEKS, 1977).

CONCLUSION

Les recherches cytologiques et cytochimiques entreprises sur *Dunaliella bioculata* confirment les premières recherches effectuées sur l'espèce voisine *D. tertiolecta* (OLIVEIRA et al., 1980). Elles montrent que ces Algues unicellulaires sans paroi possèdent à leur surface un revêtement fibrillaire comparable au «cell-coat» de nombreux types de cellules animales. Dans le domaine végétal, ce revêtement a été mis en évidence dans quelques cas (ROLAND, 1969; RYTER et HELLIO, 1980; OLIVEIRA et al., 1980; LAUR et JONSSON, 1983; CHARDARD, 1984; DE VECCHI et GRILLI CAIOLA, 1986), mais sa structure n'avait pas été nettement décrite. Chez *D. bioculata*, on a vu que les fibrilles qui le composent sont de deux types : les unes courtes et abondantes recouvrent le feuillet externe du plasmalemme avec lequel elles font corps; leur structure est difficile à déterminer. Les autres, plus longues et moins denses, sont implantées irrégulièrement à la surface du plasmalemme. Toutes deux sont de nature glycoprotéique et portent des charges négatives qui pourraient être dues à des fonctions acides et, pour certaines au moins, à de l'acide sialique. Cependant, d'autres expériences utilisant des inhibiteurs des fonctions acides (méthylation) devraient être entreprises pour préciser ce point.

La recherche de l'acide sialique par voie chimique a montré que celui-ci est présent à la surface de la cellule de *Dunaliella*, bien qu'en très faible quantité. Il pourrait donc être considéré comme un des responsables des charges négatives détectées sur les microfibrilles. Mais les charges négatives mises en évidence par voie cytochimiques semblant relativement abondantes, on peut se demander si d'autres groupements électronégatifs, par exemple les groupements phosphate ou sulfate ne sont pas présents eux aussi, bien qu'ils n'aient pas été formellement identifiés.

Les incidences de la présence d'une telle structure et des fonctions qu'elle porte n'ont pas encore été envisagées, mais on peut penser qu'elles sont importantes dans différents domaines : dans celui de l'absorption des ions et des molécules où il est possible que le «cell-coat» se comporte comme une résine échangeuse d'ions et fixe certains corps électropositifs; dans celui de la reconnaissance des cellules où la présence de molécules chargées doit établir à la surface des cellules une sorte de carte d'identité cellulaire (REISERT 1980); dans celui de la reproduction enfin, si on en croit les résultats récemment obtenus par LAUR et JONSSON (1983) et par JONSSON et al. (1985).

BIBLIOGRAPHIE

- CHARDARD R., 1984 — Détection au microscope électronique des sites anioniques du plasmalemme des protoplastes de feuilles de blé, *109e Congr. Natl. Soc. Savantes Dijon 1984*, II : 119-130.
- DANON D., GOLDSTEIN L., MARIKOVSKY Y. et SKUTELSKY E., 1972 — Use of cationized ferritin as a label of negative charges on cell surface. *J. Ultrastruct. Res.* 38 : 500-510.
- DE VECCHI L. et GRILLI CAIOLA M., 1986 — An ultrastructural and cytochemical study of *Anabaena* sp. (Cyanophyceae) envelopes. *Phycologia* 25 : 415-422.
- EVANS L.V. et HOLLIGAN M.S., 1972 — Correlated light and electron microscope studies on brown algae. *New Phytol.* 71 : 1161-1172.
- GASIC G.J. et BERWICK L., 1963 — Hale stain for sialic acid-containing mucins. *J. Cell Biol.* 19 : 223.
- GASIC G.J., BERWICK L. et SORRENTINO M., 1968 — Positive and negative colloidal iron as cell surface electron stain. *Lab. Invest.* 18 : 63-71.
- GILKES N.R. et WEECK G., 1977 — The purification and characterisation of *Dictyostelium discoideum* plasma membrane. *Biochem. Biophys. Acta* 464 : 142-156.
- GRAHAM R.C. et KARNOVSKY M.J., 1966 — The early stage of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* 14 : 291-302.
- GRIZEAU D., CALVAYRAC R. et PUISEUX-DAO S., 1982 — Action de l'éthyl-S-dipropylthiocarbamate (EPTC) et de certains de ses antagonistes sur la croissance de *Dunaliella bioculata*. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 294, ser. III : 355-358.
- HELLIO R. et RYTER A., 1980 — Relationships between anionic and lectin receptors in the plasma membrane of *Dictyostelium discoideum* and their role in phagocytosis. *J. Cell Sci.* 41 : 89-104.
- HEPLER P.K., 1980 — Membrane in the mitotic apparatus of barley cells. *J. Cell Biol.* 86 : 490-499.
- JONSSON S., LAUR M.L. et PHAM-QUANG L., 1985 — Mise en évidence de différents types de glycoprotéines dans l'extrait inhibiteur de la gamétogenèse chez *Enteromorpha prolifera*, chlorophycée marine. *Cryptogamie, Algologie* 6 : 253-264.
- KARNOVSKY M.J., 1965 — A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27 : 137 A.
- LAUR M.L. et JONSSON S., 1983 — Détection d'acides sialiques — ou de substances apparentées — chez *Enteromorpha prolifera* (Müller) J. Agardh. *Cryptogamie, Algologie* 4 : 105-110.
- LUFT J.H., 1966 — Ruthenium red staining of the striated muscle cell membrane and the myotendinal junction. In *Electron microscopy* vol. II : 65-66, R. UYEDA éd., Maruzen, Tokyo.
- LUFT J.H., 1976 — The structure and properties of the cell surface coat. *Int. Rev. Cytol.* 45 : 291-382.
- MATOSKA J. et SIRACKY J., 1980 — Negative surface charge of epithelial cells from benign and malignant breast tissues in organ culture. *Biol. cell.* 39 : 221-224.
- NICOLSON G.L., 1972 — A rapid method for determining the topological distribution of anionic sites on membrane surfaces. *J. Supramol. Struct.* 1 : 159-164.
- NICOLSON G.L., 1973 — Anionic sites of human erythrocytes membranes. I - Effect of trypsin phospholipase C and pH on the topography of bound positively charged colloidal particles. *J. Cell Biol.* 57 : 373-387.

- NILSSON J.R. et BEHNKE O., 1971 — Studies on a surface coat of *Tetrahymena*. *J. Ultrastruct. Res.* 36 : 542-544.
- OLIVEIRA L., BISAPULTRA R. et ANTON J., 1980 — Ultrastructural observation of the surface coat of *Dunaliella tertiolecta* from staining with cationic dyes and enzymes treatments. *New Phytol.* 85 : 385-392.
- RAMBOURG A., 1967 — Détection des glycoprotéines en microscopie électronique : coloration de la surface cellulaire et de l'appareil de Golgi par un mélange acide chromique-phosphotungstique. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 265 : 1426-1429.
- REISERT P.S., 1980 — Plant cell surface structure and recognition phenomena with reference to symbiose. *Int. Rev. Cytol. suppl.* 12 : 71-112.
- ROLAND J.C., 1969 — Mise en évidence sur coupes ultrafines de formations polysaccharidiques directement associées au plasmalemme. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 269 : 939-941.
- RYTER A. et HELLIO R., 1980 — Electron microscope study of *Dictyostelium discoideum* plasma membrane and its modifications during and after phagocytosis. *J. Cell. Sci.* 41 : 75-88.
- SCHREVEL J., KIEDA CI., CAIGNEUX E., GROS D., DEMOTTE F. et MONSIGNY M., 1979 — Visualization of cell surface carbohydrates by a general two-step lectin technique : lectins and glycosylated cytochemical markers. *Biol. Cell* 36 : 359-366.
- THIERY J.P., 1967 — Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscop.* 6 : 987-1018.
- THIERY J.P. et RAMBOURG A., 1974 — Cytochimie des polysaccharides. *J. Microscop.* 21 : 225-232.
- VENABLE J.H. et COGGESHALL R., 1965 — A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 25 : 407-408.
- WARREN L., 1959 — The barbituric acid assay of sialic acids. *J. Biol. Chem.* 234 : 1971-1975.

EXPLICATION DES FIGURES

Toutes les figures se rapportent à *Dunaliella bioculata* cultivée en milieu de culture artificiel. Les conditions de fixation et de traitement sont brièvement indiquées. La barre située dans le bas de la figure représente 0,25 μm , sauf spécification contraire.

Fig. 1 : Le plasmalemme (dont la structure caractéristique est bien visible par endroit) est recouvert sur sa face externe par un revêtement de structure imprécise (flèche). GA-caco 0,1 M pH 7,2-saccharose-OsO₄; color. : acét. uran.-Pb. Fig. 2 : Peroxydase révélée par la DAB-4-HCl et H₂O₂. Le liseré noir qui ceinture la cellule indique la présence de l'enzyme adsorbée sur la partie externe du plasmalemme. Fig. 3 : Témoin de l'expérience précédente, réalisée sans HPR : aucun dépôt n'apparaît à la surface du plasmalemme. Fig. 4 : Traitement par le ferro-osmium. Les fibrilles courtes situées sur le feuillet externe du plasmalemme sont nettement mises en évidence. Dimension de la barre : 0,1 μm .

Fig. 5 : Réaction PATAG. Mise en évidence de microfibrilles à la surface du plasmalemme. Dimension de la barre : 0,5 μm . GA-caco + saccharose-OsO₄. Fig. 6 : Réaction PATAG. Détail du plasmalemme et des fibrilles du «cell-coat» soulignées par les grains d'argent. fl: fibrilles longues; rfc: fibrilles courtes pl: plasmalemme. Fig. 7 : Réaction PATAG. Plasmalemme coupé subtangentiellement et montrant la base des microfibrilles (flèches). Fig. 8 : Réaction PATAG. Autre aspect du plasmalemme avec des fibrilles plus ou moins réfléchies vers la base (fl). Fig. 9 : Réaction PATAG. Témoin traité sans acide périodique : aucun dépôt d'argent n'est visible à la surface du plasmalemme (pl).

Fig. 10 : Ferritine cationisée. Des amas de FC sont déposés de place en place et à une certaine distance du plasmalemme (flèche). Fig. 11 : Amas de ferritine, détail. Présence de fibrilles (flèches) très faiblement contrastées, entre les amas de ferritine et le plasmalemme, laissant supposer que seules les extrémités des fibrilles portent des charges négatives. Fig. 12 : Hydroxyde de fer colloïdal. Un dépôt noir intense entoure toute la cellule. Dimension de la barre : 0,5 μm . Fig. 13 : Hydroxyde de fer colloïdal, détail. On observe un dépôt mince et continu directement appliqué sur le plasmalemme et des amas non adhérents au plasmalemme (flèches).

Fig. 14 : Action de la pronase sur la cellule vivante (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 mn) suivie d'une réaction avec la FC. Le dépôt de ferritine, très mince est directement appliqué sur le plasmalemme (flèches). Cet aspect est différent de celui obtenu après action de la FC seule (comparer avec les fig. 10 et 11). Fig. 15 : Même technique. Action de la pronase pendant 60 mn. Il n'existe plus aucun marquage par la FC. Le plasmalemme (pl) reste encore visible. Fig. 16 : Action de la neuraminidase sur les cellules vivantes suivie d'une réaction avec HFC. On observe un mince dépôt de fer à la surface de la cellule. Ce dépôt est cependant plus mince que dans les cellules non traitées par la Nanase (Fig. 12 et 13). Fig. 17 : Action de la Nanase suivie d'une réaction avec FC. On n'observe aucun dépôt de FC à la surface de la cellule. On remarque également que le plasmalemme a disparu, sans doute désorganisé par le traitement enzymatique.

Fig. 18 : Rouge de ruthénium, 0,1 %. Coupe longitudinale d'un flagelle. Le RR révèle le «cell-coat» sur le plasmalemme coupé perpendiculairement en haut et subtangentiellement en bas de la figure. Dans ce dernier cas, on voit que le «cell-coat» n'a pas une répartition homogène et qu'il semble affecter une disposition en «nid d'abeilles». Fig. 19 : Rouge de ruthénium 0,1 %. Aspect de la surface cellulaire où l'on observe des amas colorés par le RR sous forme de monticules isolés (flèches) ou associés localement en un mur continu (double flèche). Fig. 20 : Détail de la fig. précédente. Aspect des monticules constitués de microfibrilles colorées par le RR et agglomérées en amas homogènes sous l'effet des charges positives du RR (flèches).









